

The effect of different diets on faecal markers related to colorectal cancer risk: studies with vegetarians and urolithiasis patients

Citation for published version (APA):

van Faassen, A. (1996). *The effect of different diets on faecal markers related to colorectal cancer risk: studies with vegetarians and urolithiasis patients*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University Press. <https://doi.org/10.26481/dis.19960510af>

Document status and date:

Published: 01/01/1996

DOI:

[10.26481/dis.19960510af](https://doi.org/10.26481/dis.19960510af)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

General discussion and conclusions

8.1 Introduction

In this thesis we reported about the effect of habitual dietary pattern (omnivorous, vegetarian, vegan and Ca-restricted) on the faecal markers of effective dose related to CRC risk that were known in 1990: bulk, pH, defaecation frequency, secondary BA, LCFA and butyrate, one of the main SCFA. Our studies were based on the hypothesis that meat, dietary fibre and Ca are related to CRC risk and that biomarkers of the biologically effective dose occur in the faecal stream.

The faecal markers that uptill now are most strongly related to CRC risk and most sensitive to dietary modulation, are secondary BA and daily faecal bulk. A low concentration of secondary BA and a high faecal bulk, which are the result of a diet low in saturated fat, high in dietary fibre and resistant starch, may prevent hyperproliferation of colorectal mucosal cells. A low proliferation activity means a decreased DNA replication, and therefore a lower chance that mutations are fixed and will lead to neoplastic cells (1).

Other potential faecal markers of the biologically effective dose are the concentration of LCFA in faeces and/or faecal water and the concentration of Ca and/or Mg in faecal water (this thesis), the activity of the bacterial enzyme β -glucuronidase in faeces (2), the concentration of diacylglycerol in faeces (3) and the in vitro production of butyrate (4).

In this chapter the results of our studies with widely different designs (analytical chemistry, metabolic, epidemiological correlation, animal and human experimental, clinical trial) will be discussed in relation to:

1. the results of other studies of dietary effects on faecal markers of exposure
2. new knowledge on the relation between these and other faecal markers and CRC risk
3. new data about dietary and environmental factors and CRC risk.

The significance of the results for CRC risk of an omnivorous, vegetarian and ovo-lacto-vegetarian diet and of the Ca-restricted diet of urolithiasis patients is discussed.

At the end, a model is proposed how diet may influence CRC risk by constituents of the faecal stream and how patients with Ca-oxalate stones should be metabolically diagnosed and treated by dietary measures.

8.2 Analysis of faecal bile acids

The validity and reproducibility of the analysis of faecal BA has been studied in detail. The developed GLC-method is accurate and valid for the main BA in human faeces (chapter 2). New techniques like capillary GLC prompted us to modify the method, which could measure also the 3 β -isomers of the main BA in human faeces (chapter 3). For the measurement of the low concentrations of BA in faecal water, another capillary GLC column and other derivatives of the BA have to be used. Also enzymatic deconjugation and solvolysis were omitted because in healthy subjects without gastrointestinal pathology only a minor amount of faecal BA occur as conjugates or sulphates (chapter 4). Compared to other published methods from laboratories in Munich (5), Helsinki (6) and Wageningen (7) our method of chapter 4, which was described in detail in De Kok et al (8), gives identical results for the main BA in human faeces (Table 1).

TABLE 1
Concentrations (mmol/g dry weight) of BA in a pool sample of freeze-dried faeces from 40 healthy subjects (9)

	Wageningen	Helsinki	Munich	Maastricht
Lithocholic acid	4.1	4.5	3.8	4.3
Deoxycholic acid	5.3	10.4	6.2	5.0
Chenodeoxycholic acid	0.2	0.5	0.4	0.2
Cholic acid	0.3	0.9	0.6	0.3

The remarkably higher BA concentrations found by the Helsinki laboratory may relate to their habit to consider all peaks in the gaschromatogram that appear after LC as BA. However, analysis by GLC-mass spectrometry performed by Glatz and coworkers revealed that this faecal pool contains appreciable amounts of compounds that can not be identified as BA (Glatz and Stellaard, personal communication).

Simplified methods like the enzymatic method (10), the one which measures BA and LCFA in one GLC run (11) or a recently published method using high performance liquid chromatography (12), do not measure all individual BA correctly. The 3 β -isomers of the BA are not measured in the enzymatic method and are not reported by the other methods. Moreover, the other methods do not report data about 7- and 12-keto BA. LC and DC and their 3 β -isomers and the 7- and the 12-keto BA are called secondary BA, because they are produced by the bacteria of the large intestine from the primary BA chenodeoxycholic and cholic acid. These primary BA are formed in the liver from cholesterol.

8.3 Faecal bulk and faecal bile acids

In our metabolic ward study with an omnivorous, lacto-ovo-vegetarian and vegan diet (chapter 3), the concentration of the main faecal BA, DC, was reduced by a large amount of dietary fibre and enhanced by a high amount of Ca in the diet. Dietary fibre increased the daily faecal bulk (13), and therefore lowered the concentration of DC. Ca will have increased the excretion of DC by gastrointestinal binding to insoluble Ca (14). There was a positive correlation between faecal bulk and Ca-intake in the study with habitual omnivores and vegetarians: $r = 0.28$; $P > 0.1$ (chapter 4) and in the trial with urolithiasis patients (chapter 7): $r = 0.68$; $P < 0.01$. Moreover, in this study the change in Ca-intake correlated significantly with the change in faecal bulk. An increase of the Ca-intake above 1000 mg/day increased faecal bulk in rats and humans (15,16). It may be caused by a higher excretion of Ca and of fatty acids due to their reduced absorption. Faecal bulk is also increased by intake of 'resistant starch' (17) and intake of an inhibitor of starch digestion (18). The larger faecal bulk of males compared to females was confirmed in our studies (chapter 4 and 7).

Faecal bulk was negatively associated with CRC-incidence in a correlation study in England. A bulk higher than 200 g/day would decrease the CRC risk 3 times to values like that of Japan. Daily stool weight is highly correlated with transit time (and defaecation frequency) until 150 g faeces/day (19).

The intake of dietary fibre, especially from vegetables, is consistently and negatively correlated with the risk of CRC in retrospective studies (19-22). No clear association between fibre or vegetable intake and colon cancer risk in

men was found in a prospective epidemiological study (23), but in a prospective study in women, the group with the highest animal fat and lowest crude fibre intake had the highest risk of colon cancer (24).

The ratio CDC to ILC + LC (primary to secondary BA) was significantly higher on the vegan diet than on the omnivorous diet (chapter 3), which was probably caused by the pH 6.7 of three-fold diluted faeces. This ratio did not differ between habitual omnivores and vegetarians (chapter 4). The ratio primary to secondary BA decreased after subtotal colectomy in familial adenomatous polyposis patients. It was attributed to the absence of the colon with his bacterial flora and the pH 5.5 of two-fold diluted faeces (25). The dehydroxylation enzyme which converts primary to secondary BA, is inhibited *in vitro* at a pH lower than 5.5 (26). At more usual conditions like a lacto-ovo-vegetarian (chapter 4) or a Ca-restricted diet (chapter 7), no significant correlation between faecal pH and the ratio primary to secondary BA in faeces was found.

Neither the concentration of faecal BA nor the ratio hydrophobic (mono+dihydroxy) to hydrophylic (keto+trihydroxy) BA (26) differed between habitual omnivores and vegetarians. However the concentration of BA in the aqueous part of the faeces was lower in the vegetarians. Moreover defaecation frequency and faecal bulk were higher in this population. Thirty percent of the variance in the concentration of DC in faecal water was explained by the intake of saturated fat, while twenty-four percent could be explained by the intake of cholesterol. Twenty percent of the variance in faecal bulk could be explained by the intake of dietary fibre, especially from fruit and vegetables. Also, faecal bulk was higher in men than in women (chapter 4).

In our study in rats and humans with dietary Ca-binders (chapter 5 and 6), neither the concentrations of BA and LCFA in caecal and faecal water respectively, nor the ratio hydrophobic to hydrophilic BA or the pH were influenced by a lower availability of Ca and Mg. On the other hand, the concentrations of BA and LCFA in total faeces decreased. The results may be explained by the lowering of the bioavailability of Ca below 1000 mg/day: there are indications from literature (15,16) that Ca-supplementation above 1000 mg/day increases faecal bulk. In our cross-sectional study (chapter 4) no relation was found between faecal pH and Ca-intake below 1000 mg/day. A higher faecal bulk will decrease the concentration of BA in faecal water as can be derived from our study with the habitual omnivores and vegetarians (chapter 4). This may be the result of binding of BA to solid material such as calcium ions. Moreover, the fat content of the diet during the trial with Calcisorb® was much lower than the amount for which Newmark et al. (27)

proposed their hypothesis, that a diet high in Ca and Mg may lower CRC risk by making BA and LCFA less water-soluble. This hypothesis may be only valid at high intakes of saturated fat, which lead to high faecal concentrations of BA and LCFA. Such an effect has been found for Ca in rats (28).

The Ca-restricted diet of hypercalciuria type II patients lowered the concentrations of BA in faecal water and also the cytotoxicity of faecal water, but faecal pH did not change (chapter 7). This may be due to the lower intake of saturated fat that unintentionally accompanied the Ca-restriction in these patients due to omission of dairy products. Based on the regression equation derived from our previous cross-sectional study (chapter 4), a decrease of about 90 $\mu\text{mol/l}$ BA could be predicted by the decrease in saturated fat. The expected enhancing effect of the lower intake of Ca as derived from the data of van der Meer and Govers (29) would be about 40 $\mu\text{mol/l}$. Therefore the lowering effect of the diet is predominating. The ratio hydrophobic to hydrophilic BA did not change after Ca-restriction, as would be expected by the data of Lapré et al (30). They found a decrease in the ratio hydrophobic to hydrophilic BA in faecal water after Ca-carbonate supplementation of volunteers to 3000 mg/day but no lower concentration of BA in faecal water. This was ascribed to the low baseline values of BA in faecal water. Govers and van der Meer (29) supplemented volunteers with Ca from milk products to 1800 mg/day and found a lower concentration of BA in faecal water. This result may have been caused by the higher daily faecal weight after Ca-supplementation.

In a large randomized trial with men, no changes in the concentration of BA in faecal water were detected after supplementation with 3000 mg Ca-carbonate, but a statistically significant increase in the concentration of DC in faecal water (31). However, their method of isolating faecal water is disputable, because they dilute faeces 1:1 with water before centrifuging. In this way, an equilibrium between the concentrations of BA in the solid and in the aqueous phase of the faeces may be disturbed.

A recent, small study in which was corrected for factors influencing BA excretion like cholecystectomy and liver function, and in which faeces were sampled during 5 days, showed that faecal BA were statistically significant higher in patients with adenomatous polyps in the large intestine than in controls. Also CRC patients had higher concentrations than controls although this difference was not statistically significant (32). Adenomatous polyps are considered as precursors of CRC (33). In a randomized trial of a low-fat, high-fibre diet to prevent the recurrence of colorectal polyps, the rate of neoplastic polyp recurrence increased with the concentration of BA in faeces (34). In an *in vitro* study using colon cancer cell lines, the cytotoxicity

of the BA at concentrations occurring in faecal water, increased with the hydrophobicity of the BA and the time of exposure (35). The mechanism underlying the cytotoxicity of BA is most probably the activation of protein kinase C, directly or indirectly by stimulating the formation of diacylglycerol (36). Protein kinase C is a key enzyme in cell proliferation (37).

Not all epidemiological studies found an increased CRC risk after a diet high in saturated (animal) fat. Most studies found a positive relation with red meat (23) and eggs (38). The mode of cooking red meat may be an additional risk factor, because during the process of cooking or frying at high temperatures, heterocyclic amines are formed. These substances are activated to carcinogenic compounds by the cytochrome P450 system of liver and intestine and transported by the blood to different organs. The metabolic activation is increased in rapid metabolizing phenotypes and by smoking (39). Eggs may be a risk factor because these food products contain unsaturated fatty acids and cholesterol, which combination has been shown to increase faecal bile acid excretion in humans (40). Moreover, the lecithin in eggs is a powerful inducer of the gallbladder contraction, thereby increasing the faecal excretion of BA.

8.4 Defaecation frequency

The role of defaecation frequency in CRC-risk is still unknown. In the Dutch cohort study on diet and cancer (41) no relation between defaecation frequency asked by questionnaire and CRC-incidence was found in males (Bausch-Goldbohm, unpublished results). The validity of asking for defaecation frequency was tested in our Ca-restriction study: the Spearman correlation coefficient between asked and registered defaecation frequency was 0.84 ($P < 0.01$). In the studies of chapter 4 and 7, defaecation frequency was higher in man than in women. Would defaecation frequency play a role in CRC risk of women?

In our study with habitual omnivores and vegetarians (chapter 4) 35% of the variance in defaecation frequency was explained by sex and the intake of dietary fibre, especially fibre from fruits and vegetables. In the Ca-restriction study, 26% of the variance was explained by sex and the intake of dietary fibre.

8.5 Faecal pH

Faecal pH was lowered by a vegan diet (chapter 3). Thirty percent of the variance in faecal pH was explained by the intake of Ca (chapter 4). A higher explanation was obtained when the Ca-concentration in faeces and the concentration of one of the main short chain fatty acids (SCFA), butyrate, in faecal water was put into the regression equation ($r^2 = 0.47$): a lower concentration of Ca and a higher concentration of butyrate lead to a lower pH. A significant positive correlation between Ca in faeces and faecal pH was also found in the Ca-restriction study (chapter 7): $r = 0.45$. Moreover in that study, a high pH of faecal water was correlated with a low cytotoxicity of faecal water (Spearman correlation coefficient = -0.63 , $p < 0.01$). The cytotoxicity of faecal water for erythrocytes was highly correlated with that for cells derived from a human colon adenocarcinoma cell line (42) and with hyperproliferation of colonic cells of rats (43). The positive correlation between Ca-intake and faecal pH has been explained by the increase in faecal phosphate after Ca-supplementation, which may increase the buffer capacity of faeces (16).

Earlier studies have reported that faecal pH is higher in patients with CRC than in controls (chapter 1). However a more recent study showed no difference for age matched groups (44). They found higher faecal pH's in older subjects. Also no difference was found in a case-control study measuring gastrointestinal pH by a pH sensitive radiotelemetry capsule (45).

In literature (17) a positive association between pH and percentage solubilized BA has been suggested. We did not find such a relation in our studies (chapter 4 and 7). We propose a CRC protecting effect of a high faecal pH: at a higher pH the secondary BA and the LCFA are more dissociated and therefore less hydrophobic. Both compounds were more cytolytic when their hydrophobicity increased (42).

8.6 Calcium and magnesium in faecal water

In our study in animals and humans with dietary Ca-binders (chapter 5 and 6), binding of dietary Ca by Calcisorb® leads to lower concentrations of Ca and Mg in caecal and faecal water respectively. The concentration of Ca or Mg in faecal water may be related to CRC-risk (46,47). Both ions have a direct inhibitory effect on colonic cell proliferation. The concentration of Ca in faecal water was not lowered on the Ca-restricted diet (chapter 7). Lapré et al (30) found higher concentrations of Ca in faecal water after supplementa-

tion with Ca-carbonate from 1200 to about 3000 mg/day, but Govers et al (16) found no significant increase after supplementation with Ca from milk products from 800 to about 1800 mg/day.

No epidemiological or animal studies have been performed on the CRC risk of low concentrations of Ca and Mg in faecal water.

8.7 Long chain fatty acids in faecal water

The concentrations of LCFA in faecal water were not influenced in animals and humans by a lower availability of Ca and Mg (chapter 5 and 6). On the other hand, faecal excretion values of LCFA were lower after binding Ca and Mg. The hypothesis of Newmark (28) that a diet high in Ca and Mg lowers CRC risk by making LCFA less water-soluble, may be only valid for Ca at high intakes of saturated fat, which lead to high faecal concentrations of LCFA as in the studies of Lapré and Govers, where the intake of saturated fat was 120 g/day, while the intake in our human study was only 85 g/day.

The Ca-restricted diet of hypercalciuria type II patients does lower the concentration of LCFA in faecal water and also the cytotoxicity of faecal water (chapter 7). The concentration of LCFA in faecal water was highly correlated with the cytotoxicity of faecal water for erythrocytes ($r=0.74$). Moreover the correlation between changes in both variables was 0.60.

The relation between faecal LCFA and CRC-risk has not been reported after the study of Sperry et al (48). They are suspected of increasing CRC because like BA, they activate protein kinase C directly or through the activation of phospholipase D (49).

8.8 Dietary treatment of urolithiasis patients

Risk factors for Ca-oxalate stones are the enhanced excretion of oxalate, Ca, urate, the decreased excretion of the inhibitors citrate and Mg as well as low urinary volume. The excretion of oxalate is the most important risk factor (50).

From our intervention study it appears that a diet restricted in Ca to 500 mg/day has a small benefit for hypercalciuric urolithiasis patients, because it

lowers the excretion of oxalate, most probably due to the lower content of protein and carbohydrates of this diet. This also lowered the concentration of BA and LCFA in faecal water and its cytotoxicity.

The expected lowering of the Ca-excretion in urine by the Ca-restricted diet occurred slightly and only in men. The reasons for this effect may be:

1. Women react in a different way from men on Ca-restriction. Studies reported in literature on the effects of a Ca-restricted diet on Ca-excretion have been performed mainly in men (chapter 7)
2. The lowering effect reported in literature was measured after 4 days, while only after 10 days of Ca-restriction the concentration of calcitriol in serum will increase (51) and this will increase the Ca-excretion with urine (52)
3. Not all patients in our intervention study were true hypercalciuria type II patients because their diagnosis was based on a Ca-excretion > 5 mmol/day and a lowered Ca-excretion after a diet restricted in Ca, sodium and oxalate. Some may be more sensitive for the effect of sodium on Ca-excretion (53), others may be normal calciuretic and respond too slightly on a Ca-restriction to 400 mg/day (54). At our Dept. of Clinical Chemistry, normal values of urinary Ca-excretion are 1.4 - 7.5 mmol/day.

Therefore the following scheme (see Figure 1) for diagnosis and dietary treatment of patients with Ca-oxalate stones should be studied for its effectiveness and feasibility. Firstly, stone composition should be analyzed preferentially by IR-spectroscopy or X-ray diffractometry to distinguish the different kinds of stones (55). **Patients with a primary Ca-oxalate stone** are screened in the following way:

1. Medical history including medications, clinical chemical analysis of 24 h urine for volume, creatinine, urate, oxalate, glyoxylate, citrate, urea, Na, K, Mg, fasting urine for pH and fasting serum for Ca, phosphate, parathyroid hormone 1-84, a dietary anamnesis and antropometric data on height and body weight. A pyelogram is made to detect anatomical abnormalities.
2. Creatinine excretion lower than 20 mg/kg body weight means wrong sampling of 24 h urine (56). A new sample of 24 h urine has to be collected.
3. Hyperuricosuria (> 450 μ mol/d) and urinary pH < 5.5 in the absence of excessive intestinal alkali loss or animal protein intake, will be caused by gouty diathesis. The concentration of uric acid in serum will also be increased (57). If pH is normal, the uricosuria maybe due to a high intake of meat or fish products, beer or coffee (58). These dietary habits can be detected from the dietary and urinary data: urea-excretion > 250 mmol/d

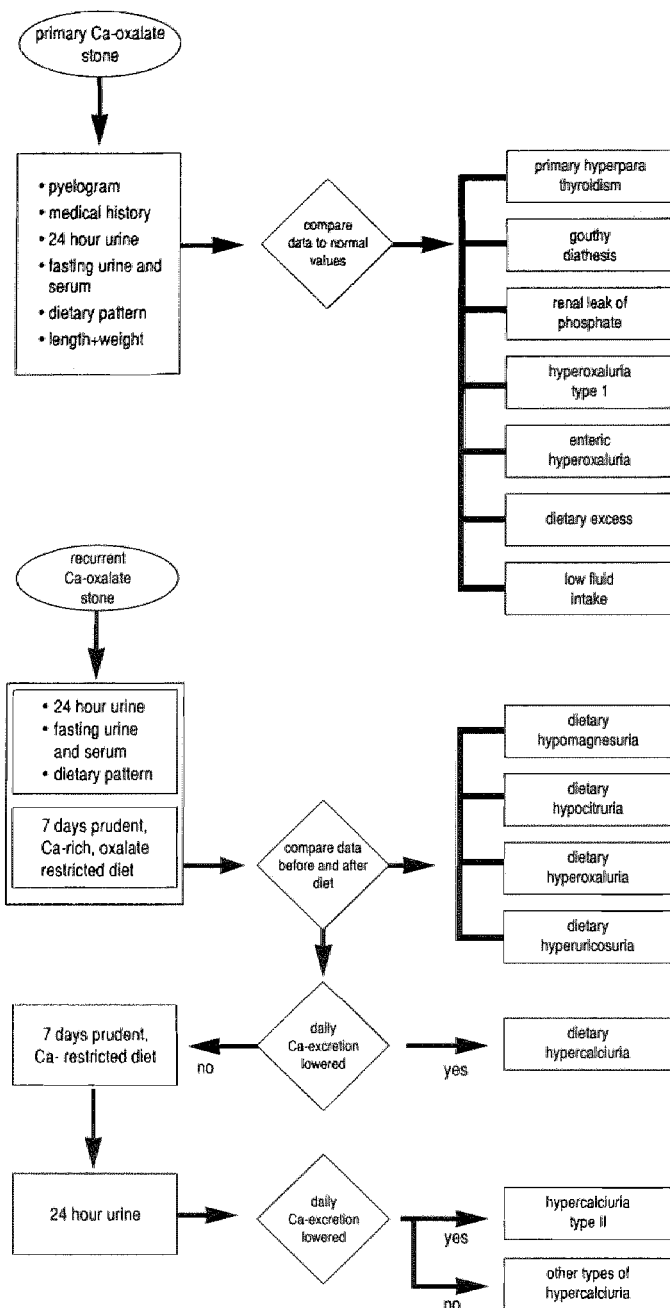


FIGURE 1
Proposed metabolic screening of Ca-oxalate stone patients

means an intake of animal protein higher than 50 g/day (S. Houterman, personal communication). A prudent diet (see below), restricted a.o. in animal protein will be the dietary therapy. With gouty diathesis or if the diet is inadequate, allopurinol or potassium citrate should be given.

4. Hyperoxaluria ($>450 \text{ } \mu\text{mol/d}$) with a high concentration of urinary glyoxylate means a pyridoxine deficiency (primary hyperoxaluria type I). These patients should be treated with pyridoxine and if not effective with citrate (59). Other hyperoxalurias may be caused by bowel disturbances (60) or a high intake of animal protein or oxalate-rich products. Bowel disturbances should be treated with Ca-supplementation (1.5 g/d) and a diet with minimal amounts of oxalate. The other hyperoxalurias can be corrected by dietary measures.
5. Hypocitraturia (citrate $< 2.1 \text{ mmol/d}$) may be due to a high intake of animal protein or salt (61). The therapy should be a prudent diet (see below).
6. Hypercalciuria (Ca $> 5 \text{ mmol/d}$) (57) with serum phosphate $> 0.8 \text{ mmol/l}$ means a renal leak of phosphate. Orthophosphate is the therapy. If serum Ca $> 2.6 \text{ mmol/l}$ and serum parathyroid hormone $1-84 > 58 \text{ pg/ml}$ the diagnosis is primary hyperparathyroidism. They can be treated with parathyroid surgery.

The other types of hypercalciuria should be checked by their dietary intake of protein, Na, K, Ca, carbohydrates, mono- and dissacharides, oxalate-rich products, energy, fluid and Mg-rich products (62). The data on dietary intake of the first 4 components can be confirmed by urinary data on urea, Na, K, Ca, while the intake of fluid must correlate with the amount of daily urine. A high intake of carbohydrates, mono- and dissacharides and energy may be reflected in a body mass index > 25 . If there are large deviations from normal values and/or eating pattern shows large meals in the evening (63), a prudent diet (see below) equally spread over the day with a high intake of fluid ($> 2.5 \text{ l}$ urine per day,) are prescribed. The patients can control their intake of fluid by measuring the specific gravity of urine ($< 0.012 \text{ g/l}$) by dip-sticks (64,65).

Recurrent stone patients (a stone within an interval of 2 yrs), patients with stones in both kidneys and patients of age < 18 yrs should be studied for the causes of their hypercalciuria, hyperoxaluria, hyperuricosuria, hypocitraturia and/or hypomagnesuria on a Ca-rich and if necessary on a Ca-low diet (66,67):

1. They consume during one week a constant, prudent diet: 30 g animal protein, 1000 mg K, 3100 mg Na, 120 g mono- and disaccharides, 30 energy of fat, 300 mg Mg, at least 1.5 l fluid, no more than 4 glasses of beer, no more than 3 cups of coffee/day. Moreover, this experimental diet should contain no oxalate-rich products like spinach or rhubarb. The

Ca-content of the diet will be about 400 mg. The compliance to the diet can be derived from data on urinary urea, K and Na. The other amount of Ca (600 mg) is standardized and can be checked by giving Ca-gluconate-tablets (6 per day) and counting pills that are not used. Comparing data of 24 h urine before and after this week for urea, Ca, Na, K, phosphate, uric acid, Mg, oxalate and citrate will detect a dietary origin of these abnormalities. They can be treated with a prudent diet, that is palatable and also active against other chronic diseases like cardiovascular diseases and several forms of cancer.

2. Patients who show no decrease in Ca-excretion on the diet mentioned in 1., should consume the constant, prudent diet for one week containing only the basal 400 mg Ca. If normalization of Ca occurs, while the urinary excretions of Na, Mg, K and urea are constant, these patients have an hyperabsorption of dietary Ca and should be treated with a Ca- and oxalate-restricted diet (hypercalciuria type II). Further research is needed to form a group of patients that is at high risk for osteopenia on this diet.
3. Patients whose Ca-excretion does not respond to the Ca-restricted diet should be treated with thiazide + K-citrate + Na-restricted diet (150 mmol/d) and high fluid intake divided over day and night. Further research is needed to split these patients into groups in which mainly the bones, the kidney or the intestine are involved.

Conclusions

Based on the results of the studies described in this thesis and on the literature described and discussed above, the model for the role of faecal constituents in the pathogenesis of CRC have to be adapted (Figure 2). The faecal constituents influence the proliferation of colonic epithelial cells. Increased cell proliferation is associated with a higher expression of mutations.

The influences of several dietary factors on the faecal constituents are shown.

Meat and meatproducts are rich in saturated fat, while eggs are rich in cholesterol. Both are supportive for higher concentrations of BA and LCFA in faeces and faecal water. Vegetables and grains are rich in dietary fibre and resistant starch, leading to a higher faecal bulk and a lower faecal pH. A high faecal bulk diminishes the concentration of BA and LCFA in faeces and faecal water. Dietary fibre and resistant starch will diminish faecal pH by increasing the butyrate production in the colon. A low pH will increase the amount of LCFA and undissociated BA in the colonic contents, which will increase the hyperproliferation of epithelial cells. However, butyrate will lower this hyper-

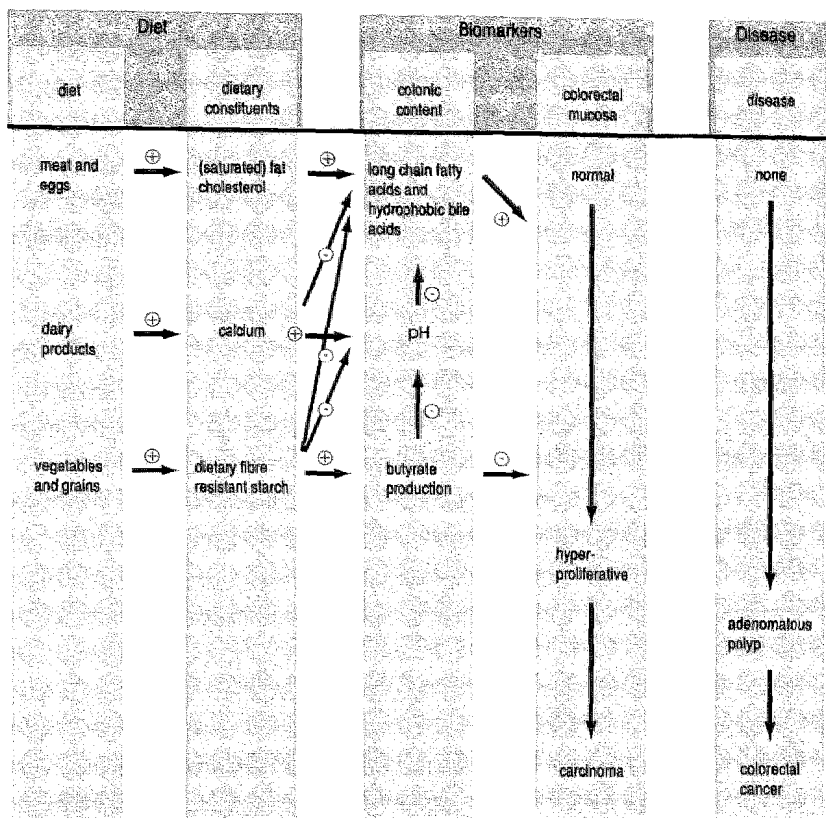


FIGURE 2

Proposed model for the role of diet and faecal markers in colorectal carcinogenesis

proliferation. Dietary Ca above 1000 mg/day may decrease the amount of solubilized BA and LCFA and the ratio hydrophobic to hydrophilic BA in faecal water.

A diet rich in dietary fibre and resistant starch and restricted in saturated fat may diminish the risk for CRC. Vegan diets may protect against CRC, in spite of their resulting low faecal pH, due to their low content of saturated fat and their high dietary fibre content. Lacto-ovo-vegetarian diets which may not be that high in dietary fibre, may be protective because of their lower amount of saturated fat and their higher amount of Ca than the vegan and the omnivorous diet. A prudent diet which is rich in dietary fibre from grains and fruits and vegetables, sufficient in milkproducts and fluids and moderate in meat, eggs, sugar and table salt may exert a similar protective effect as the vegetarian diets.

A diet restricted in Ca in which the omitted milkproducts are not substituted by products rich in animal protein like meat and eggs, may be of a small benefit for male urolithiasis patients genetically predisposed to Ca-oxalate stones, without increasing the risk of CRC. However in such women, that diet may be ineffective and may even raise the risk of osteoporosis. A prudent diet as described by the Dutch guidelines for a healthy diet (see above), should fulfill all requirements at the same time with regard to the risk of urolithiasis, osteoporosis and CRC.

References

1. Fearon, E.R., Vogelstein, B. A genetic model for colorectal carcinogenesis. *Cell* 61 (1990) 759-767
2. Reddy, B.S., Engle, A., Simi, B., Goldman, M. Effect of dietary fiber on colonic bacterial enzymes and bile acids in relation to colon cancer. *Gastroenterology* 102 (1992) 1475-1482
3. Morotomi, M., Guillem, J.G., LoGerfo, P., Weinstein, I.B. Production of diacylglycerol, an activator of protein kinase C, by human intestinal microflora. *Cancer Res.* 50 (1990) 3595-3599
4. Clausen, M.R., Bonnen, H., Mortensen, P.B. Colonic fermentation of dietary fibre to short chain fatty acids in patients with adenomatous polyps and colonic cancer. *Gut* 32 (1991) 923-928
5. De Kok T.M.C.M., Levels, P.J., Faassen, A. van, Hoor, F. ten, Kleinjans, J.C.S. Chromatographic methods for the determination of toxicants in faeces. *J. Chromatography* 580 (1992) 135-159
6. Stellaard, F., Kalek, H.D., Kruis, W., Paumgartner, G. Determination of increased bile acid excretion by determination of bile acid content in a single stool sample. *Clinica Chimica Acta* 140 (1984) 85-90
7. Miettinen, T.A. Gas-liquid chromatographic determination of fecal neutral sterols using a capillary column. *Clin.Chim.Acta* 124 (1982) 245-248
8. Glatz, J.F.C., Schouten, F.J.M., Den Engelsman, G., Katan, M.B. Quantitative determination of neutral steroids and bile acids in human feces by capillary gas-liquid chromatography. In: *Cholesterol metabolism in health and disease: studies in the Netherlands*. A.C. Beynen, M.J.H. Geelen, M.B. Katan, J.A. Schouten (ed), Wageningen, Ponsen&Looijen, 1985, p. 103-112
9. Katan, M.B., Beynen, A.C., De Vries, J.H.M., Nobels, A. Existence of consistent hypo- and hyperresponders to dietary cholesterol in man. *Am.J. Epidemiol.* 123 (1986) 221-234
10. Sheltawy, M.J., Losowsky, M.S. Determination of faecal bile acids by an enzymatic method. *Clin.Chim.Acta* 64 (1975) 127-132
11. Child, P., Aloe, M., Mee, D. Separation and quantitation of fatty acids, sterols and bile acids in feces by gas chromatography as the butyl ester-acetate derivatives. *J. Chromatogr.* 415 (1987) 13-26
12. Guldutuna, S., You, T., Kurts, W., Leuschner, U. High performance liquid chromatographic determination of free and conjugated bile acids in serum, liver biopsies, bile, gastric juice and feces by fluorescence labeling. *Clin.Chim.Acta* 214 (1993) 195-207

Samenvatting

De invloed van verschillende voedingen op kenmerken van de ontlasting die samenhangen met het risico op dikke darmkanker. Onderzoek met vegetariërs en niersteenpatiënten.

Dikke darmkanker (colon- en rectumkanker) is de op één na meest voorkomende vorm van kanker bij vrouwen en de op twee na meest voorkomende bij mannen in de meeste Westerse landen. De behandeling d.m.v. operatie, medicijnen en/of bestraling kan slechts bereiken dat 5 jaar na behandeling nog 50% van de patiënten in leven is. Daarom is het gewenst ook aandacht te schenken aan de preventie van dikke darmkanker.

Het lijkt erop dat het voorkomen van dikke darmkanker beïnvloed wordt door omgevingsfactoren, o.a. voedingsgewoonten. Het risico is ook genetisch bepaald, maar groepen mensen met voedings- en andere leefgewoonten die sterk verschillen van de gemiddelde bevolking zoals Zevende dags adventisten, Mormonen en vegetariërs, hebben een lagere sterfte tengevolge van dikke darmkanker.

Onderzoek naar het ontstaan van dikke darmkanker heeft laten zien, dat deze ziekte ontstaat door veranderingen in delen van het DNA die betrokken zijn bij de vorming van kanker. De tijd tussen de eerste verandering en het optreden van de ziekte is tenminste 20 jaar. Daarom is er gezocht naar biologische kenmerken van dit risico die naar voren komen in die 20 jaar. Omdat de dikke darm in contact staat met het bloed en met de darminhoud, zouden kenmerken van de omgevingsfactoren die dikke darmkanker veroorzaken, in deze delen van het lichaam te vinden moeten zijn. Resten van de darminhoud komen terecht in de ontlasting en onderzoek van de ontlasting zal dan ook informatie moeten kunnen opleveren over risico's voor het ontstaan van dikke darmkanker.

In **hoofdstuk 1** zijn de onderzoeksgegevens die beschreven zijn in de literatuur voor het begin van ons laatste onderzoek (1990), samengevat. Op grond hiervan gingen we ervan uit dat een voeding met veel vlees, weinig voedingsvezel en weinig calcium samenhangt met een hoog risico op dikke darmkanker. Kenmerken van de ontlasting die hoogst waarschijnlijk samenhangen met het risico op dikke darm kanker en die veranderen onder invloed van voedingsgewoonten, zijn:

- de hoeveelheid ontlasting per dag
- de concentraties van de secundaire galzuren deoxycholzuur en lithocholzuur en van vetzuren zoals stearinezuur in de gehele ontlasting en in het waterige deel van de ontlasting
- de zuurgraad van de ontlasting.

Het doel van de onderzoeken in dit proefschrift was na te gaan of gebruikelijke voedingsgewoonten die verschillen in de dagelijkse hoeveelheid vlees, voedingsvezel en calcium, zoals een omnivore, een lacto-ovo-vegetarische en een veganistische voeding en het calcium-beperkte dieet van niersteenpatiënten, invloed hebben op de ontlastingskenmerken die samenhangen met het risico op dikke darmkanker. Als de effecten in dezelfde richting wijzen als de gegevens over de invloed van voedingsgewoonten op het risico voor dikke darmkanker, dan kunnen in epidemiologische onderzoeken de biologische kenmerken gebruikt worden als factor ter voorspelling van het risico op ziekte en hoeft niet gewacht te worden tot zich een tumor ontwikkeld heeft. Als de gegevens over de ontlastingskenmerken passen bij een biologische verklaring voor de veronderstellingen over voeding als oorzaak van het ontstaan van dikke darmkanker, dan worden die veronderstellingen ondersteund.

Allereerst hebben we een nauwkeurige en juiste methode ontwikkeld voor de bepaling van de concentratie van de meest voorkomende galzuren in de menselijke ontlasting, deoxycholzuur en lithocholzuur (**hoofdstuk 2**). Met de hierop gebaseerde methoden die in onze verdere onderzoeken werden gebruikt, zijn getallen voor beide galzuren werden verkregen die overeenkwamen met de resultaten uit andere laboratoria. Bovendien kunnen de in lagere hoeveelheden voorkomende galzuren zoals de 3β -isomeren van deoxy- en lithocholzuur en de 7- en 12-keto-galzuren bepaald worden. Deoxy-, lithocholzuur en hun 3β -isomeren en de keto-verbindingen worden ook wel de secundaire galzuren genoemd, omdat ze gevormd worden door de bacterien in de dikke darm uit de de in de lever gevormde primaire galzuren cholzuur en chenodeoxycholzuur.

Hoofdstuk 3 beschrijft de resultaten van een streng gecontroleerd onderzoek met jonge, mannelijke vrijwilligers, die drie typen voedingen na elkaar gebruikten. Een lacto-ovo-vegetarische voeding (vegetarisch met melk en eieren) en een veganistische voeding (alleen plantaardige producten) verlaagden de concentraties van deoxy- en lithocholzuur in de totale ontlasting en verhoogden de hoeveelheid ontlasting per dag en het aantal keren ontlasting per week. Deze effecten werden hoogst waarschijnlijk veroorzaakt door de grotere hoeveelheid voedingsvezel in vergelijking met de gemengde voeding

(vlees, eieren, melk- en plantaardige producten). De concentratie van de som van deoxy- en lithocholzuur in de totale ontlasting was hoger tijdens de lacto-ovo-vegetarische voeding dan tijdens de veganistische voeding. Dit werd in de discussie toegeschreven aan de grotere hoeveelheid calcium in de lacto-ovo-vegetarische voeding. De zuurgraad van de ontlasting was lager tijdens de veganistische voeding dan tijdens de twee andere voedingen.

Uit andere epidemiologische onderzoeken komt vaak naar voren, dat een hogere inname van voedingsvezel gepaard gaat met een lager risico op dikke darmkanker. Groepen mensen met een dagelijkse hoeveelheid ontlasting van meer dan 200 gram hadden een 3 maal zo laag risico op dikke darmkanker. In een klein onderzoek bleek dat patiënten met adenomateuze poliepen in de dikke darm, een voorstadium van dikke darmkanker, hogere concentraties van de secundaire galzuren in de ontlasting hadden dan gezonde controles. Ook bleken patiënten met ontstekingen van de dikke darm die een hoge concentratie hadden van deoxycholzuur in de ontlasting, later meer kans te hebben een dikke darmtumor te ontwikkelen dan soortgelijke patiënten met een lage concentratie.

M.a.w. de concentratie van secundaire galzuren in de ontlasting zou in epidemiologisch onderzoek gebruikt kunnen worden als factor ter voorspelling van het risico op dikke darmkanker. De betekenis van de hoeveelheid ontlasting per dag, het aantal keren ontlasting per week en de zuurgraad van de ontlasting moet nog nader onderzocht worden in prospectieve epidemiologische onderzoeken alvorens ze te gebruiken als biologisch kenmerk van het risico op dikke darmkanker. Onze resultaten ondersteunen de veronderstelling dat een hogere inname van voedingsvezel beschermt tegen het ontstaan van dikke darmkanker.

In **hoofdstuk 4** staan de resultaten beschreven van een onderzoek bij mannen en vrouwen tussen de 59 en 67 jaar die gedurende lange tijd gewoon waren een lacto-ovo-vegetarische voeding of een omnivore voeding (mengsel van vlees, eieren, melk en plantaardige producten) te gebruiken. De lacto-ovo-vegetariërs hadden geen lagere concentraties van galzuren in de totale ontlasting maar wel een lagere concentratie in het waterige deel van de ontlasting. Dit deel wordt verkregen na centrifugatie op hoge snelheid en wordt verondersteld in contact te staan met de cellen van de darmwand. De hoeveelheid ontlasting per dag en het aantal keren ontlasting per week was hoger bij de vegetariërs dan bij de omnivoren en hoger bij mannen dan bij vrouwen. De zuurgraad van de ontlasting verschilde niet tussen de omnivoren en de vegetariërs. In **hoofdstuk 8** is beschreven, dat dertig procent van de variatie in de concentratie van deoxycholzuur in het waterige deel van de ontlasting verklaard kon worden door de hoeveelheid verzadigd vet die per dag werd gegeten, terwijl 24 % van de variatie verklaard kon worden uit de inname van

cholesterol. Daarnaast kon nog twintig procent van deze variatie verklaard worden door geslacht en hoeveelheid ontlasting per dag. Ook kon twintig procent van de variatie in de hoeveelheid ontlasting per dag en het aantal keren ontlasting per week verklaard worden door de hoeveelheid voedingsvezel, vooral uit groente en fruit. De helft van de variatie in de zuurgraad kon verklaard worden door de concentratie van calcium in de ontlasting en de concentratie van één van de belangrijkste vluchtige vetzuren, boterzuur, in het waterige deel van de ontlasting.

Niet alle epidemiologische onderzoeken laten zien dat de inname van verzadigd vet gepaard gaat met een verhoogd risico op dikke darmkanker. Maar het veel eten van voedingsmiddelen als rood vlees en eieren, hangt wel samen met een verhoogd risico. Het verband tussen de concentratie van secundaire galzuren in het waterige deel van de ontlasting en het risico voor dikke darmkanker, is nog niet onderzocht in grootschalige epidemiologische onderzoeken.

Uit onderzoek door anderen was gebleken dat calcium-supplementatie de concentratie van galzuren in het waterige deel van de ontlasting kon verlagen. Bovendien hadden epidemiologische en experimentele onderzoeken laten zien, dat een hoge calcium-inname beschermend zou kunnen zijn voor het ontstaan van dikke darmkanker. De effecten van calcium-beperking op biologische kenmerken voor het risico op dikke darmkanker waren nog niet onderzocht.

In hoofdstuk 5 is een onderzoek beschreven met ratten die een stof kregen toegediend om calcium en magnesium uit de voeding niet beschikbaar te maken voor absorptie in de dunne darm: ethyleen diamine tetra azijnzuur of te wel EDTA. In hoofdstuk 6 is beschreven wat er gebeurde als vrijwillige mannen een medicijn innamen, dat door een bepaalde groep niersteenpatiënten wordt gebruikt om te voorkomen dat er te veel calcium uit de voeding wordt opgenomen in de dunne darm: Calcisorb®. In beide gevallen werd verwacht, dat de concentraties van galzuren en vetzuren in het waterige deel van de darminhoud, respectievelijk ontlasting, zouden stijgen. Er werden echter geen verschuivingen gevonden in de concentraties. Dit is mogelijk veroorzaakt door de verlaging van de beschikbaarheid van calcium tot beneden de 1000 mg/dag. Uit de literatuur zijn aanwijzingen verkregen, dat calcium-supplementatie tot ruim boven de 1000 mg/dag de hoeveelheid ontlasting per dag verhoogt. Deze hogere hoeveelheid faeces per dag verlaagt waarschijnlijk de hoeveelheid galzuren in het waterige deel van de ontlasting, zoals af te leiden is uit ons onderzoek met de habituele omnivoren en vegetariërs.

De concentraties van calcium en magnesium in het waterige deel van de darminhoud, respectievelijk ontlasting, waren lager na de interventie. De

mogelijke rol van deze lagere concentraties voor het ontstaan van dikke darmkanker moet nog nader onderzocht worden in dierexperimentele en epidemiologische onderzoeken, omdat beide mineralen ook een direct verlagend effect hebben op celdeling.

Het laatste onderzoek dat beschreven is in hoofdstuk 7, betrof de nadelige gevolgen van het calcium-beperkte dieet van een groep niersteenpatiënten (hypercalciurie type II) voor de kenmerken van de ontlasting die samenhangen met het risico op dikke darmkanker. Dit dieet wordt voorgeschreven, omdat deze patiënten te veel calcium absorberen in de dunne darm en daardoor te veel calcium uitscheiden in de urine. Ook hier werd een stijging van de concentraties van gal- en vetzuren in het waterige deel van de ontlasting verwacht. Echter deze concentraties daalden evenals de toxiciteit van het waterige deel van de ontlasting in een test met rode bloedcellen. Deze effecten werden hoogst waarschijnlijk veroorzaakt door de lagere inname van (verzadigd) vet en cholesterol die gepaard ging met de calcium-beperking door het weglaten van melkprodukten. De toxiciteit voor rode bloedcellen hing het sterkst samen met de concentratie van vetzuren in het waterige deel van de ontlasting. De toxiciteit van het waterige deel van de ontlasting voor rode bloedcellen is gebleken goed overeen te komen met de toxiciteit voor epitheelcellen van de dikke darm en met de mate van celdeling in de dikke darm bij ratten. Vetzuren zouden het risico op dikke darmkanker kunnen verhogen, omdat ze evenals galzuren het enzym proteïne kinase C activeren. Dit enzym speelt een cruciale rol bij het delen van cellen. Het verband tussen de concentratie van vetzuren in het waterige deel van de ontlasting en het risico op dikke darmkanker moet nog onderzocht worden in dierexperimentele en epidemiologische onderzoeken. De pH van het faecale water daalde niet, maar aan het begin van het onderzoek gingen hoge waarden gepaard met grote hoeveelheid calcium in de ontlasting. Ook bleken hoge pH waarden samen te gaan met lage waarden van de toxiciteit voor rode bloedcellen. Hoge waarden van de hoeveelheid ontlasting hingen samen met een hoge inname van calcium, gemeten door het optellen van de dagelijkse uitscheiding van calcium met de urine en de ontlasting, vooral boven 1000 mg calcium per dag. Bovendien kon 65 % van de variatie in de verandering van de hoeveelheid ontlasting per dag door het calcium-beperkte dieet verklaard worden door de verandering in calcium-inname.

In het onderzoek uit hoofdstuk 7 werden ook de effecten van het dieet op risicofactoren voor de vorming van calciumoxalaat-nierstenen gecheckt. De uitscheiding van calcium in de urine daalde iets en alleen bij mannen. De uitscheiding van oxalaat daalde, hoewel niet statistisch significant. De citraatuitscheiding veranderde niet.

Op grond van de afwezigheid van het verwachte effect van het calcium-beperkte dieet op de risicofactoren voor de vorming van calcium-oxalaat nierstenen en recente gegevens uit andere onderzoeken, wordt in **hoofdstuk 8** een nieuw schema voorgesteld voor de diagnose en therapie van niersteenpatiënten met calciumoxalaat-stenen, dat nog getest moet worden op efficiëntie en uitvoerbaarheid. Patiënten met een eerste niersteen worden onderzocht met medische, klinisch-chemische en antropometrische methoden. Als er geen metabole afwijkingen worden gevonden, wordt een gezonde voeding volgens de Nederlandse richtlijnen voorgeschreven, bestaande uit normalisering van de hoeveelheid dierlijk eiwit, eieren, suiker en keukenzout, voldoende calcium en vocht en rijk aan groente en fruit. Van patiënten met terugkerende calciumoxalaat-stenen wordt 24 uren urine geanalyseerd voor en na een streng gecontroleerd dieet volgens de Nederlandse voedingsrichtlijnen en een vaste hoeveelheid calcium in tabletvorm. Patiënten bij wie de risicofactoren in de urine zoals calcium, oxalaat, uraat, citraat, magnesium dalen en stoffen in de urine die indicatoren zijn voor de het voorgeschreven dieet zoals ureum en natrium, ook dalen, krijgen een gezonde voeding aanbevolen. Patiënten bij wie de calcium-uitscheiding in de urine niet daalt op het dieet met calcium, maar wel op het dieet zonder de calcium-tabletten, worden gediagnosticeerd als patiënten met hypercalciurie type II. Alleen deze groep krijgt een calcium-en oxalaatbeperkt en vochtrijk dieet. Verder onderzoek is nog nodig om na te gaan welke van deze patiënten een verhoogd risico op botontkalking hebben tengevolge van dit dieet.

Tenslotte wordt in **hoofdstuk 8** een aangepast model gepresenteerd voor de rol van ontlastingskenmerken bij het ontstaan van dikke darmkanker en de invloed van voedingsbestanddelen op deze kenmerken. Bestanddelen van de ontlasting zoals vetzuren en hydrofobe galzuren in het waterige deel van de ontlasting kunnen de deling van epitheelcellen van de dikke darm verhogen. Hierdoor komen veranderingen in het DNA van deze cellen eerder tot uiting. Er zijn sterke aanwijzingen dat een voeding bestaande uit alleen plantaardige producten (veganistisch) beschermend zal zijn tegen het ontstaan van dikke darmkanker door zijn laag gehalte aan verzadigd vet en cholesterol en zijn hoog gehalte aan voedingsvezel en langzaam verteerbaar zetmeel. Hierdoor zullen de concentraties van hydrofobe galzuren en van vetzuren in het waterige deel van de ontlasting laag zijn. Bovendien zal de grote hoeveelheid voedingsvezel en langzaam verteerbaar zetmeel de productie van boterzuur in de dikke darm verhogen, waardoor de deling van de epitheelcellen van de dikke darm geremd wordt. Lacto-ovo-vegetarische voeding die niet zo'n lage hoeveelheid verzadigd vet bevat als een veganistische voeding, zal beschermen tegen dikke darmkanker omdat ze een grote hoeveelheid voedingsvezel, langzaam verteerbaar zetmeel en calcium bevat. De voedingsvezel en het calcium

zullen de hoeveelheid ontlasting per dag verhogen en daardoor de concentraties van hydrofobe galzuren en vetzuren in het waterige deel van de ontlasting verlagen. Bovendien zal het calcium de zuurgraad van de ontlasting verhogen, waardoor de hoeveelheid ongedissocieerde secundaire galzuren zal afnemen. Juist deze ongedissocieerde galzuren zijn hydrofoob en daardoor toxisch voor cellen. Omnivore voeding die meestal weinig voedingsvezel, soms weinig calcium en vaak veel (verzadigd) vet en cholesterol uit vlees en eieren bevat, zal het risico op dikke darmkanker verhogen.

Het risico op niersteenvorming bij mannen die erfelijk belast zijn met een verhoogd risico op calciumoxalaat-stenen, kan mogelijk iets verlaagd worden. Het risico op dikke darmkanker zal niet stijgen als de melkprodukten niet vervangen worden door voedingsmiddelen rijk in dierlijk eiwit, zoals vlees en eieren, of door andere voedingsmiddelen. Echter voor vrouwen is dit diet waarschijnlijk niet effectief en verhoogt het mogelijk hun risico op botontkalking. Een voeding zoals beschreven in de Nederlandse richtlijnen voor gezonde voeding, zal voldoen aan de aanbevelingen voor verlaging van het risico op herhaalde vorming van calciumoxalaat-nierstenen en tegelijk aan die voor de vermindering van het risico op botontkalking en dikke darmkanker.